

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Bacitracin**

**Art. No. R2901**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung  
von Bacitracin

Enzyme immunoassay for the quantitative determination  
of bacitracin

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Please contact for questions and further information:

Zentrale/Switchboard

Tel./Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Auftragsannahme/Order department

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

E-Mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing & Vertrieb/Marketing & sales

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-Mail : [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

RIDA<sup>®</sup> und RIDASCREEN<sup>®</sup>  
sind eingetragene Marken der R-Biopharm AG  
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

R-Biopharm AG ist ISO 9001 zertifiziert.

RIDA<sup>®</sup> and RIDASCREEN<sup>®</sup>  
are registered trademarks of R-Biopharm AG  
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

## Kurzinformation

RIDASCREEN® Bacitracin (Art. Nr.: R2901) ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Bacitracin in Milch, Fleisch, Eiern, Futtermitteln und Urin.

Alle Reagenzien für die Durchführung des Enzymimmunoassays - inkl. Standards - sind im Testkit enthalten.

Ein Testkit ist ausreichend für 96 Bestimmungen (einschl. Standardbestimmungen).

Zur Auswertung wird ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt..

Probenvorbereitung: Milch: pH-Wert einstellen, Entfettung, Verdünnung  
Fleisch, Eier, Futtermittel: Homogenisierung, Extraktion, Zentrifugation, Verdünnung  
Urin: Verdünnung

Zeitbedarf: Probenvorbereitung (für 10 Proben)  
Milch ..... ca. 30 min  
Fleisch ..... ca. 45 min  
Eier ..... ca. 45 min  
Futtermittel..... ca. 45 min  
Urin ..... ca. 15 min  
Testdurchführung (Inkubationszeit)..... 1,5 h

Nachweisgrenze: Milch ..... ca. 11 µg/kg (ppb)  
(bezogen auf die Fleisch ..... ca. 9 µg/kg (ppb)  
Standardsubstanz) Eier ..... ca. 11 µg/kg (ppb)  
Futtermittel..... ca. 82 µg/kg (ppb)  
Urin ..... ca. 23 µg/kg (ppb)

Wiederfindung: Milch ..... ca. 99 %  
(bezogen auf die Fleisch ..... ca. 122 %  
Standardsubstanz) Eier ..... ca. 110 %  
Futtermittel..... ca. 87 %  
Urin ..... ca. 84 %

Die Spezifität des RIDASCREEN® Bacitracin - Tests wurde durch die Bestimmung der Kreuzreaktivität zu den entsprechenden Substanzen im Puffersystem ermittelt. In Proben kann die Spezifität aufgrund von Matrixeffekten von den im Puffersystem ermittelten abweichen. Vor der Analyse von kreuzreaktiven Substanzen muss deren Nachweisgrenze und Wiederfindungsrate in der jeweiligen Matrix durch den Anwender bestimmt werden. Der Test kann nicht zwischen Analyten und kreuzreaktiven Substanzen diskriminieren.

Spezifität:	Bacitracin (Standardsubstanz) .....	100 %
	Virginiamycin .....	< 3 %
	Tylosin .....	< 2 %
	Spiramycin, Neomycin, Colistin.....	< 1 %

Zur Erhöhung der Prüfungsqualität bei ELISA-Verfahren verweisen wir zusätzlich auf unser ELISA-Handbuch in der jeweiligen Fassung. Dieses führt Mindeststandards hinsichtlich der Rahmenbedingungen auf, die bei der Verwendung von Testsystemen der R-Biopharm AG und der Durchführung von ELISA-Analysen mit diesen Testsystemen zu beachten sind. Das Handbuch kann unter der Webseite [www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik](http://www.r-biopharm.com/de/produkte/lebensmittel-futtermittelanalytik) abgerufen, gedruckt und gespeichert werden.

## 1. Verwendungszweck

RIDASCREEN® Bacitracin ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Bacitracin in Milch, Fleisch, Eiern, Futtermitteln und Urin.

## 2. Allgemeines

Bacitracin gehört zur Gruppe der Polypeptidantibiotika. Es wurde nach dem produzierenden *Bacillus*-Stamm und dem 7-jährigen Mädchen „Tracy“ benannt, aus deren offener Schienbeinfraktur der Stamm 1945 erstmals isoliert wurde. Bacitracin besteht aus einer Mischung unterschiedlicher Polypeptide, wobei Bacitracin A als Hauptkomponente die größte biologische Aktivität besitzt. Durch die Inhibition der Zellwandsynthese besitzt es eine bakterizide Breitbandwirkung gegen grampositive, als auch gegen gramnegative Bakterien.

Neben dem veterinärmedizinischen Einsatz kann Bacitracin in der Tierzucht auch als Wachstumsbeschleuniger eingesetzt werden. Dabei können Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs verbleiben und ein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher darstellen. Der unsachgemäße Gebrauch von Antibiotika fördert zudem die Bildung von antibiotikaresistenten Keimen, welche eine zunehmende gesundheitliche Gefahr für die Bevölkerung darstellen. Bacitracin wurde daher durch die Verordnung 2821/98/EC aus der Liste der für die Tierernährung zugelassenen Zusatzstoffe (Richtlinie 70/524/EEG Anhang B) gestrichen. Zudem wurden Rückstandshöchstmenge in Lebensmitteln festgelegt (Verordnung 37/2010/EC).

### 3. Testprinzip

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit anti-Bacitracin-Antikörpern beschichtet. Zugegeben werden Standards bzw. Probelösung und enzymmarkiertes Bacitracin (Konjugat). Freies und enzymmarkiertes Bacitracin konkurrieren um die Bacitracin-Antikörperbindungsstellen (kompetitiver Enzymimmunoassay). Nicht gebundenes, enzymmarkiertes Bacitracin wird anschließend in einem Waschschrift wieder entfernt. Der Nachweis erfolgt durch Zugabe von Substrat/Chromogen. Gebundenes Konjugat wandelt das Chromogen in ein blaues Endprodukt um. Die Zugabe der Stopp Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm; die Extinktion der Lösung ist umgekehrt proportional zur Bacitracin-Konzentration in der Probe.

### 4. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 96 Bestimmungen durchgeführt werden (einschließlich Standardbestimmungen). Jedes Testkit enthält:

Komponente	Deckelfarbe	Zustand		Inhalt
<b>Microtiter plate</b> Mikrotiterplatte	-	gebrauchsfertig		96 Kavitäten
<b>Sample buffer</b> Probenpuffer	weiß	gebrauchsfertig		40 ml
<b>Standard 1</b> Standard 1	weiß	gebrauchsfertig	0 µg/L	2 ml
<b>Standard 2</b> Standard 2	weiß	gebrauchsfertig	0,625 µg/L	1 ml
<b>Standard 3</b> Standard 3	weiß	gebrauchsfertig	1,25 µg/L	1 ml
<b>Standard 4</b> Standard 4	weiß	gebrauchsfertig	2,5 µg/L	1 ml
<b>Standard 5</b> Standard 5	weiß	gebrauchsfertig	5 µg/L	1 ml
<b>Standard 6</b> Standard 6	weiß	gebrauchsfertig	10 µg/L	1 ml
<b>Standard 7</b> Standard 7	weiß	gebrauchsfertig	20 µg/L	1 ml
<b>Wash buffer</b> Waschpuffer	weiß	Konzentrat	20x	30 ml
<b>Conjugate</b> Konjugat	rot	Konzentrat	100x	0,1 ml
<b>Conjugate buffer</b> Konjugat Puffer	grün	gebrauchsfertig		15 ml
<b>Substrate/Chromogen</b> Substrat/Chromogen Red Chromogen Pro	braun	gebrauchsfertig		12 ml
<b>Stop Solution</b> Stopp Lösung	gelb	gebrauchsfertig		15 ml

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 5.1. Geräte:

Gerät	Milch	Fleisch, Eier Futtermittel	Urin
Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)	•	•	•
Messpipetten	•	•	•
variable 20 µl - 200 µl und 200 - 1000 µl Mikropipetten	•	•	•
pH-Meter	•		
Mixer		•	
Schüttler		•	
Vortex	•		
Zentrifuge	•	•	

### 5.2. Reagenzien:

Reagenz	Milch	Fleisch, Eier Futtermittel
0,1 M NaOH zur pH-Wert Einstellung	•	
80 % (v/v) Methanol in Probenpuffer		•

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) zu diesem Produkt auf unserer Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de).

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Komponenten des Testkits auf keinen Fall einfrieren.

Nicht benötigte Kavitäten zusammen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und weiterhin bei 2 - 8 °C lagern.

Das rötlich gefärbte Substrat/Chromogen ist lichtempfindlich, deshalb direkte Lichteinwirkung vermeiden.

Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit-Außenetikett unter Expiration) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Ein Austausch von Einzelreagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht zulässig.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

- bläuliche Färbung des rötlichen Substrat/Chromogen vor Zugabe in die Kavitäten
- Extinktion kleiner 0,6 ( $E_{450\text{ nm}} < 0,6$ ) für den Nullstandard

## 9. Probenvorbereitung

Die Proben kühl lagern.

### 9.1. Milch

- pH mit 0,1 M NaOH auf  $7 \pm 0,5$  einstellen
- zentrifugieren: 5 min / 2000 g / 4 °C
- Fettschicht entfernen
- entfettete Milch 1:10 (1+9) mit Probenpuffer verdünnen und vortexen (z.B. 20 µl entfettete Milch + 180 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

### 9.2. Fleisch, Eier und Futtermittel

- Probe vollständig homogenisieren
- 2 ml 80 % Methanol in Probenpuffer zu 1 g homogenisierte Probe geben
- schütteln: 15 min / über Kopf
- zentrifugieren: 10 min / 2000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)
- Fleisch und Eier: Überstand 1:5 (1+4) mit Probenpuffer verdünnen und vortexen (z.B. 40 µl Überstand + 160 µl Probenpuffer)
- Futtermittel: Überstand 1:20 (1+19) mit Probenpuffer verdünnen und vortexen (z.B. 10 µl Überstand + 190 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

### 9.3. Urin

- Urin 1:25 (1+24) in Probenpuffer verdünnen (z.B. 20 µl Urin + 480 µl Probenpuffer)
- 50 µl pro Kavität im Test einsetzen

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Testvorbereitungen

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Eventuell vorhandene Präzipitate in den Konzentraten vor Verdünnung durch Schütteln bei Raumtemperatur auflösen.

Das **Waschpufferkonzentrat** 1:20 (1+19) mit demineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. 2 ml Konzentrat + 38 ml demineralisiertes Wasser, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen). Der endverdünnte Waschpuffer kann bei 2 - 8 °C bis zum Ablauf des Verfallsdatums des Konzentrats gelagert werden.

Das **Bacitracin-Konjugat** liegt als Konzentrat vor. Da die rekonstituierte Konjugatlösung nur begrenzte Haltbarkeit aufweist, immer nur so viel Konjugat-Konzentrat mit Konjugat - Puffer verdünnen, wie unmittelbar benötigt wird. Das Konjugat - Konzentrat vor der Entnahme zentrifugieren (1 min / 1000 g / Raumtemperatur (20 - 25 °C)). Um die gebrauchsfertige Konjugatlösung herzustellen, muss das Konzentrat 1:100 (1+99) mit Konjugat Puffer verdünnt werden (z.B. 20 µl Konzentrat + 1980 µl Konjugat Puffer, ausreichend für 4 Mikrotiterstreifen).

### 10.2. Testdurchführung

Sorgfältiges Waschen ist sehr wichtig. Ein Eintrocknen der Kavitäten zwischen den Arbeitsschritten vermeiden.

1. So viele Kavitäten in den Halterahmen einsetzen, wie für alle Standards und Proben in Doppelbestimmung benötigt werden. Die Positionen der Standards und der Proben protokollieren.
2. Je 50 µl der Standards bzw. der vorbereiteten Proben als Doppelbestimmung und je 50 µl verdünntes Konjugat in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und die Platte 1 h bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
3. Die Kavitäten durch Ausschlagen der Flüssigkeit leeren und die Restflüssigkeit durch kräftiges Ausklopfen (dreimal hintereinander) auf saugfähigen Labortüchern entfernen. Die Kavitäten mit jeweils 300 µl Waschpuffer (siehe 10.1.) waschen. Diesen Vorgang zweimal wiederholen.
4. 100 µl Substrat/Chromogen in die Kavitäten pipettieren. Vorsichtig manuell mischen und 30 min bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubieren.
5. Je 100 µl Stopp - Lösung in jede Kavität pipettieren und vorsichtig manuell mischen. Die Extinktion bei 450 nm sofort nach Zugabe der Stopp - Lösung messen.



## 11. Auswertung

Für die Auswertung ist bei R-Biopharm eine speziell für die RIDASCREEN® Enzymimmunoassays entwickelte Software, die RIDA®SOFT Win / RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), erhältlich.

Der Verlauf der Standardkurve kann dem beigefügten Analysenzertifikat entnommen werden.

Hinweis für die Berechnung ohne Software:

$$\frac{\text{Extinktion Standard (bzw. Probe)}}{\text{Extinktion Nullstandard}} \times 100 = \% \text{ Extinktion}$$

Den Nullstandard somit gleich 100 % setzen und die Extinktionswerte in Prozent angeben. Die errechneten Werte für die Standards in einem Koordinatensystem auf halblogarithmischem Millimeterpapier gegen die Bacitracin - Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] auftragen.

Um die in den Proben enthaltene tatsächliche Bacitracin - Konzentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) zu erhalten, muss die aus der Standardkurve abgelesene Konzentration noch mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Beim Arbeiten nach der angegebenen Vorschrift gilt folgender Verdünnungsfaktor:

Milch .....	10
Fleisch, Eier.....	15
Futtermittel.....	40
Urin .....	25

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Bacitracin

## Brief information

RIDASCREEN<sup>®</sup> Bacitracin (Art. No.: R2901) is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of bacitracin in milk, meat, eggs, feed and urine.

All reagents required for the enzyme immunoassay - including standards - are contained in the test kit.

The test kit is sufficient for 96 determinations (including standards). A microtiter plate spectrophotometer is required for quantification.

Sample preparation:      milk: pH adjustment, defatting, dilution  
                                 meat, eggs and feed: homogenization, extraction,  
                                 centrifugation, dilution  
                                 urine: dilution

Time requirement:      sample preparation (for 10 samples)  
                                 milk .....approx. 30 min  
                                 meat.....approx. 45 min  
                                 eggs .....approx. 45 min  
                                 feed.....approx. 45 min  
                                 urine .....approx. 15 min  
                                 test implementation (incubation time) ..... 1.5 h

Detection limit:      milk ..... approx. 11 µg/kg (ppb)  
(corresponding to the      meat..... approx. 9 µg/kg (ppb)  
standard substance)      eggs ..... approx. 11 µg/kg (ppb)  
                                 feed..... approx. 82 µg/kg (ppb)  
                                 urine ..... approx. 23 µg/kg (ppb)

Recovery rate:      milk ..... approx. 99 %  
(corresponding to the      meat..... approx. 122 %  
standard substance)      eggs ..... approx. 110 %  
                                 feed..... approx. 87 %  
                                 urine ..... approx. 84 %

The specificity of the RIDASCREEN® Bacitracin test was determined by analyzing the cross-reactivities to corresponding substances in buffer system. In samples, the specificity may deviate from those determined in the buffer system due to matrix effects. Prior to the analysis of cross-reactive substances, the user has to determine the Limit of Detection and the Recovery for the substance in the respective sample matrix. The test cannot discriminate between analytes and cross-reactive substances.

Specificity:	Bacitracin (standard substance).....	100 %
	Virginiamycin .....	< 3 %
	Tylosin .....	< 2 %
	Spiramycin, Neomycin, Colistin.....	< 1 %

In order to increase the quality of assessment when performing ELISA-procedures, we refer additionally to our Good ELISA Practice (GEP) – Manual in the respective version. Such lists minimum standards concerning the framework conditions when using test-kits of R-Biopharm AG and performing ELISA-analysis. The manual can be retrieved, printed and downloaded under the website [www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis](http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis).

## 1. Intended use

RIDASCREEN® Bacitracin is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative analysis of bacitracin in milk, meat, eggs, feed and urine.

## 2. General

Bacitracin belongs to the group of polypeptide antibiotics. It was named after the *Bacillus* strain producing it and the 7 year old girl 'Tracy' from whose open tibial fracture the strain was isolated in 1945 for the first time. Bacitracin is a mixture of different polypeptides, wherein bacitracin A as major component has the highest biological activity. Through inhibition of cell wall synthesis, it has a broad spectrum bactericidal effect against both gram-positive and gram-negative bacteria.

In addition to veterinary application, bacitracin can be used as antimicrobial growth promoter in animal husbandry. Thereby, residues can remain in foodstuff of animal origin and may pose a health risk to consumers. Improper use of antibiotics also promotes the formation of antibiotic resistant bacteria, which raise an increasing health problem for the population. Consequently, Bacitracin has been deleted by the regulation 2821/98/EC from the list of approved animal feed additives (Directive 70/524/EEG Appendix B) and maximum residue limits in foodstuffs have been set (Regulation 37/2010/EC).

### 3. Test principle

The basis of the test is the antigen-antibody reaction. The microtiter wells are coated with antibodies directed against bacitracin. Bacitracin standards or sample and bacitracin conjugate are added. Free bacitracin and bacitracin conjugate compete for the bacitracin antibody binding sites (competitive enzyme immunoassay). Any unbound conjugate is then removed in a washing step. Substrate/chromogen is added to the wells, bound conjugate converts the chromogen into a blue product. The addition of the stop solution leads to a color change from blue to yellow. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the bacitracin concentration in the sample.

### 4. Reagents provided

Each kit contains sufficient materials for 96 measurements (including standard analyses). Each test kit contains:

Component	Cap color	Format		Volume
Microtiter plate	-	Ready to use		96 wells
Sample buffer	White	Ready to use		40 ml
Standard 1	White	Ready to use	0 µg/L	2 ml
Standard 2	White	Ready to use	0.625 µg/L	1 ml
Standard 3	White	Ready to use	1.25 µg/L	1 ml
Standard 4	White	Ready to use	2.5 µg/L	1 ml
Standard 5	White	Ready to use	5 µg/L	1 ml
Standard 6	White	Ready to use	10 µg/L	1 ml
Standard 7	White	Ready to use	20 µg/L	1 ml
Wash buffer	White	Concentrate	20x	30 ml
Conjugate	Red	Concentrate	100x	0.1 ml
Conjugate buffer	Green	Ready to use		15 ml
Substrate/Chromogen Red Chromogen Pro	Brown	Ready to use		12 ml
Stop solution	Yellow	Ready to use		15 ml

## 5. Materials required but not provided

### 5.1. Equipment:

Equipment	milk	meat, eggs, feed	urine
microtiter plate spectrophotometer (450 nm)	•	•	•
graduated pipettes	•	•	•
variable 20 µl - 200 µl and 200 - 1000 µl micropipettes	•	•	•
pH-meter	•		
mixer		•	
shaker		•	
vortex	•		
centrifuge	•	•	

### 5.2. Reagents:

Reagent	milk	meat, eggs, feed
0.1 M NaOH for pH adjustment	•	
80 % (v/v) methanol in sample buffer		•

## 6. Warnings and precautions for the users

This test should only be carried out by trained laboratory employees. The instruction for use must be strictly followed.

This kit may contain hazardous substances. For hazard notes on the contained substances please refer to the appropriate material safety data sheets (MSDS) for this product, available online at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 7. Storage instructions

Store the kit at 2 - 8 °C (35 - 46 °F). Do not freeze any test kit components.

Return any unused microwells to their original foil bag, reseal them together with the desiccant provided and further store at 2 - 8 °C (35 - 46 °F).

The reddish substrate/chromogen is light sensitive, therefore, avoid exposure to direct light.

No quality guarantee is accepted after the expiration date on the kit label.

Do not interchange individual reagents between kits of different lot numbers.

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

- any bluish coloration of the red stained substrate/chromogen prior to test implementation
- a value of less than 0.6 absorbance units ( $A_{450\text{ nm}} < 0.6$ ) for the zero standard

## 9. Preparation of Samples

The samples should be stored in a cool place.

### 9.1. Milk

- adjust pH to  $7 \pm 0.5$  with 0.1 M NaOH
- centrifuge: 5 min / 2000 g / 4 °C (39.2 °F)
- remove upper fat layer
- dilute defatted milk sample 1:10 (1+9) in sample buffer and vortex (e.g. 20 µl defatted milk + 180 µl sample buffer)
- use 50 µl per well in the assay

### 9.2. Meat, eggs and feed

- homogenize sample completely
- add 2 ml of 80 % methanol in sample buffer to 1 g of homogenized sample
- shake: 15 min / over-head
- centrifuge: 10 min / 2000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)
- meat and eggs: dilute supernatant 1:5 (1+4) with sample buffer and vortex (e.g. 40 µl supernatant + 160 µl sample buffer)
- feed: dilute supernatant 1:20 (1+19) with sample buffer and vortex (e.g. 10 µl supernatant + 190 µl sample buffer)
- use 50 µl per well in the assay

### 9.3. Urine

- dilute urine 1:25 (1+24) in sample buffer (e.g. 20 µl urine + 480 µl sample buffer)
- use 50 µl per well in the assay

## 10. Test implementation

### 10.1. Preliminary comments

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) before use.

Eventually occurring precipitates in the concentrates have to be dissolved by shaking at room temperature before dilution.

Dilute **wash buffer** concentrate 1:20 (1+19) with demineralized water (e.g. 2 ml concentrate + 38 ml demineralized water, sufficient for 4 microtiter strips). Diluted wash buffer can be stored at 2 - 8 °C (35 - 46 °F) until the shelflife of the concentrate expires.

The **bacitracin conjugate** is provided as a concentrate. Since the diluted conjugate has a limited stability, only the amount which actually is needed should be reconstituted. Before dilution, centrifuge the conjugate concentrate in the vial shortly (1 min / 1000 g / room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F)). For reconstitution, the concentrate is diluted 1:100 (1+99) in conjugate buffer (e.g. 20 µl conjugate concentrate + 1980 µl conjugate buffer, sufficient for 4 microtiter strips).

### 10.2. Test procedure

Carefully follow the recommended washing procedure. Do not allow microwells to dry between working steps.

1. Insert a sufficient number of wells into the microwell holder for all standards and samples to be run in duplicate. Record standard and sample positions.
2. Add 50 µl of standard or prepared sample to separate duplicate wells and add 50 µl of diluted conjugate to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 1 h at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
3. Pour the liquid out of the wells and tap the microwell holder upside down vigorously (three times in a row) against absorbent paper to ensure complete removal of liquid from the wells. Fill all wells with 300 µl of wash buffer (see 10.1.) and pour out the liquid again. Repeat two more times.
4. Add 100 µl of substrate/chromogen to each well. Mix gently by shaking the plate manually and incubate for 30 min at room temperature (20 - 25 °C / 68 - 77 °F) in the dark.
5. Add 100 µl of the stop solution to each well. Mix gently by shaking the plate manually and measure the absorbance at 450 nm immediately after addition of stop solution.

## 11. Results

A special software, the RIDA<sup>®</sup>SOFT Win / RIDA<sup>®</sup>SOFT Win.net (Art. No. Z9996), is available to evaluate the RIDASCREEN<sup>®</sup> enzyme immunoassays.

The course of the standard curve is shown in the Quality Assurance Certificate enclosed in the test kit.

Remark for the calculation without software:

$$\frac{\text{absorbance standard (or sample)}}{\text{absorbance zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

The zero standard is thus made equal to 100 % and the absorbance values are quoted in percentages. The values calculated for the standards are entered in a system of coordinates on semilogarithmic graph paper against the bacitracin concentration [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ].

In order to obtain the bacitracin concentration in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) actually contained in a sample, the concentration read from the calibration curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor. When working in accordance with the regulation stated, the dilution factor is as follows:

milk .....	10
meat, eggs.....	15
feed.....	40
urine.....	25

The data corresponds to our present state of technology and provides information on our products and their uses. R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. Defective products will be replaced. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

### R-Biopharm AG

Postanschrift / Postal Address:

An der neuen Bergstraße 17  
64297 Darmstadt, Germany

Sitz / Corporate Seat: Pfungstadt

Tel.: +49 (0) 61 51 - 81 02-0

Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-40

E-mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

Vorsitzender des Aufsichtsrats /

Chairman of Supervisory Board:

Dietrich Mollat

Vorstand / Board of Management:

Dr. Ralf M. Dreher (Vorsitzender / Chairman),

Dr. Carsten Bruns, Jochen Hirsch, Dr. Peter Schubert

Handelsregister / Commercial Register:

Amtsgericht Darmstadt HRB 8321